紫外・可視分光光度計による飲料中の鉄の濃度計算

山田　一人
弘前大学理工学研究科総務グループ

はじめに

紫外・可視分光光度計を用い、鉄の標準試料に対する検量線を求め、飲料中の鉄の濃度を計算した。濃度 0, 1, 2, 3, 4, 5 ppm における吸光度を測定したところ、相関係数 1.000 というきわめて精度の良い検量線が得られた。しかし、飲料の吸光度を測定したところ、予想された値よりかなり小さくなり、複数回の測定では精度が良くなかった。これは飲料が濁っていたためであり、正しく測定するためには事前にろ過する必要があったと考えられる。

１．緒言

本学理工学部地球環境学科 3 年後期の実験科目「環境地球化学実験」では、大気や水などの成分を測定する手法を習得するため、分析実験を中心に行っている。主な項目としては、酸塩基滴定、過マンガン酸カリウム滴定、キレート滴定、鉄の比色分析がある。このうち、鉄の比色分析は分光光度計を使用する機器分析法であり、測定の原理及び方法に対する理解並びに機器に対する慣れが必要である。

本実験は、鉄(II)イオンと 1,10-フェナントロリン (phen) からなる錯体の吸光度を測定し、検量線を作成し、その検量線から試料中の鉄の濃度を求めるというものである。鉄(II)イオンと phen はモル比 1:3 の錯体、トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II)イオン $[Fe(phen)_3]^{2+}$を形成する（図１）。この錯体は 508 nm に吸収極大を持ち、鉄の濃度が 10 ppm（1 ppm＝1 mg/L）以下の場合、その吸収はランベルト・ベールの法則

$$A=\log_{10}\frac{I_0}{I}=\varepsilon cl \tag{1}$$

に従う[1]。ここで、A は吸光度、I_0 と I はそれぞれ入射光及び透過光の強度、c はモル濃度 $[\mathrm{mol/L}]$、l は光路長 $[\mathrm{cm}]$ であり、ε はモル吸光係数 $[\mathrm{L/(mol\cdot cm)}]$ である。このため、鉄の濃度を変えて標準溶液を調製し、その吸光度を測定すれば、検量線を作ることができる。

また、このようにして作成した検量線から、未知試料中に含まれる鉄の濃度を求めることもできる。未知試料と phen から錯体を作り、その 508 nm における吸光度を測定し、検量線の式から濃度を計算すればよい。但し、本実験ではあらかじめ鉄の濃度が表示されている飲料を用いて測定している。これにより、表示されている濃度と測定から計算された濃度がどの程度一致しているかをみることができ、自分たちの試料溶液の調製や測定に精密に行われたかを知ることができるからである。

これらの検量線の式や未知試料中の鉄の濃度を求める際、一般的に最小二乗法という方法が用いられる。これは、いくつかの測定点から最も確からしい直線又は曲線を求める方法である。この方法を用いる場合、電卓を使用したり、表計算ソフトを利用したりすることが多い。しかし、本学部に設置されている分光光度計にはこれらの計算を自動で行う機能が備わっている[2]。この機能を利用すれば、測定からデータ処理までを 1 台の装置で行うことができる。実際、私が本実験に携わった当初はこの機能を利用していなかったものの、数年後にこの機能があることを知り、現在は本実験でもこの機能を利用して測定している。これにより、データ処理にかかる手間を大幅に省くことができた。ただ、その一方で有効数字の問題などデータ処理の精度についての懸念もある。

そこで、今回は本実験と同様の実験を私が自ら行い、実験方法やデータ処理の精度について検討した。これは、10 月から始まる本実験の練習実験も兼ねている。

２．実験方法

２.１　試薬の調製

２.１.１　0.1% phen 溶液

1,10-フェナントロリン一水和物 0.10 g を約 100 mL の熱水に溶かして調製した。この溶液は無色なので、濃度の違いは吸光度にほとんど影響しない。このため、およその濃度で構わない。

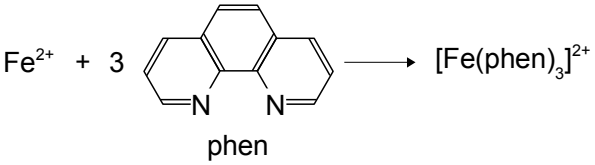

図１　鉄 (II) イオンと phen の反応。

２.１.２　10%塩酸ヒドロキシルアミン溶液

塩酸ヒドロキシルアミン 10.07 g を水に溶かし、メスシリンダーで 100 mL とした。

２.１.３　2 mol/L 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム三水和物 27.25 g を水に溶かし、メスシリンダーで 100 mL とした。

２.２　鉄の標準試料の調製

硫酸鉄(II)アンモニウム六水和物（モール塩）0.0740 g を精ひょうし、特級塩酸（1＋1）2 mL とともに水に溶かし、メスフラスコを用いて 100 mL とした。この標準溶液に含まれる鉄の濃度は 105.3 ppm である。これを 6 個のメスフラスコにホールピペットを用いてそれぞれ 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL 取り、塩酸ヒドロキシルアミン溶液を 1 mL ずつ、phen 溶液を 10 mL ずつ、酢酸ナトリウム溶液を 5 mL ずつ、ホールピペットを用いて加え、水を加えて 100 mL とした。

２.３　吸光度の測定

吸光度の測定には日立 U-2001 形ダブルビーム分光光度計を用いた。ここでは飲料中の濃度を求めるため、測定メニューでは定量演算を選び、データモードは濃度とした。測定波長は 508.0 nm とし、6 種類の標準試料の濃度をあらかじめ入力しておいた。

測定を始める前に、2 本のセル（光路長 1 cm）に水を入れ、オートゼロを行った。これにより、参照側に対する試料側の吸光度が 0 となる。次に、標準試料を濃度が薄いものから順に吸光度を測定した。測定は phen を加えてから 40 分後に行った。特定の波長についてのみ測定するので、時間がかからずにすぐ終わる。最後の試料の測定が終わると、自動的に検量線のデータが計算される。

２.４　飲料中の鉄の定量

本実験で使用した飲料はカゴメ「野菜一日これ一本」である。パッケージの成分表示によると、この飲料 200 mL 中に鉄は 0.8 mg 含まれている。すなわち、鉄の濃度は 4 ppm である。測定の際にはこれを希釈しなければならないが、標準試料の濃度を考慮し、5 倍に希釈することにした。この場合、鉄の濃度は 0.8 ppm となる。

2 本のメスフラスコに飲料をホールピペットを用いて 20 mL ずつ取り、塩酸ヒドロキシルアミン溶液をホールピペットで 1 mL ずつ加えた。次に、片方のメスフラスコにのみ phen 溶液をホールピペットで 10 mL 加えた。phen 溶液を加えていない試料はブランクである。飲料自体に色が着いているため、それによる光の吸収を差し引く必要がある。すなわち、測定では phen 溶液を加えた試料の吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値が鉄の錯体による吸光度となる。その後、両方のメスフラスコに酢酸ナトリウム溶液をホールピペットで 5 mL ずつ加え、水を加えて 100 mL とした。

測定は前述の装置を用いて行った。初めにブランクの測定を行い、次に phen 溶液を加えた試料の測定を行った。データ処理については、標準試料の測定で求められた検量線のデータが装置内に残っているので、これを用いて行った。試料の測定を行った後、自動的に試料中の鉄の濃度が計算される。

２.５　OpenOffice.org Calc によるデータ処理

２.３節及び２.４節と同様のデータ処理を OpenOffice.org 2.4.1 Calc を用いて行った。これにより、分光光度計によるデータ処理との差異を検討した。

３．結果と考察

３.１　標準試料の吸光度および検量線

標準試料中の鉄の濃度 c と吸光度 A、並びにモル吸光係数 ε との関係を表 1 に示す。ε は式 (1) から求めた。また、それから得られた検量線を図２に示す。図２には検量線の式及び相関係数 R の 2 乗の値も示した。これらは OpenOffice.org Calc で求めたものである。これを見ると、c と A はほぼ比例関係にあり、ランベルト・ベールの法則に従っていることが分かる。また、R^2=1.000 であったことから、きわめて精度の良い測定ができたと考え

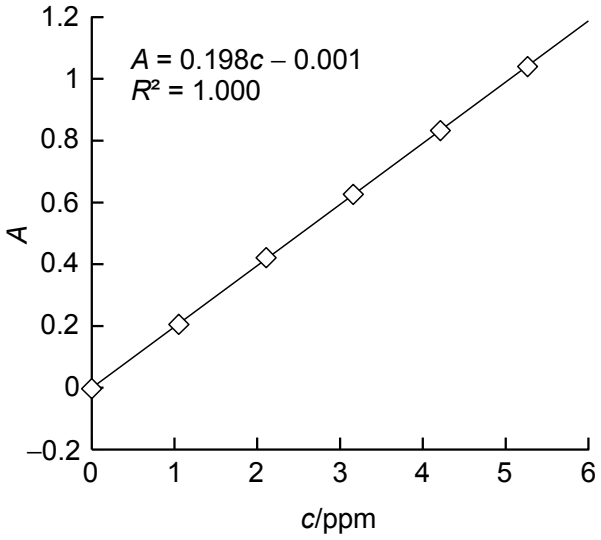

図２　鉄の濃度 c と吸光度 A との関係。

表１　標準試料中の鉄の濃度 c 、吸光度 A 、モル吸光係数 ε の関係

番号	c/ppm	A	$\varepsilon/10^4$ L·mol^{-1}·cm^{-1}
0	0.000	−0.003	—
1	1.053	0.205	1.087
2	2.106	0.421	1.116
3	3.159	0.626	1.107
4	4.212	0.833	1.105
5	5.265	1.040	1.103

られる。

一方、分光光度計で直接データ処理し、検量線の式を求めると

$$c = 5.044\,A + 0.009 \tag{2}$$

となり

$$R = 1.000,\ R^2 = 1.000$$

となった。式 (2) を変形すると

$$A = 0.198\,c - 0.002 \tag{3}$$

となるため、OpenOffice.org Calc で求めた検量線の式及び R^2 の値（図２）とほぼ等しいことが分かる。このことから、分光光度計によるデータ処理はかなり精度良く行うことができると考えられる

一方、表１の ε の値から平均を求めると、1.104×10^4 L/(mol·cm) となる。$[Fe(phen)_3]^{2+}$錯体では、ε の文献値は 11000 であり、実測値は一般に 9000 程度であることが知られている[1]。このことから、今回の結果は一般的な実測値よりも文献値に近い値が得られたことになり、試料の調製及び測定を精密に行うことができたといえる。

３.２　飲料中の鉄の定量

飲料から調製した試料について測定した吸光度 A とそれから計算して求めた鉄の濃度 c を表２に示す。1 回目の測定は標準試料と同様に phen を加えてから 40 分後に行ったが、分光光度計で計算して得られた濃度は予想された 0.8 ppm（２.４節）よりもかなり低い 0.010 ppm となった。そこでもう一度ブランクから測定したところ、吸光度が 1 回目とは異なっており、鉄の濃度にも影響が出た。

この原因について本実験を担当する教員に相談したところ、飲料には溶けずに沈殿している物質が多く、それによって $[Fe(phen)_3]^{2+}$錯体による光の吸収が不安定になるということである。実際に、本実験で使用した飲料にはトマトやにんじんなどの野菜が多く使われており、これには γ-カロテンやリコペンなどのカロテノイド類が含まれている。γ-カロテンは 508.5 nm に[3]、リコペンは 502 nm に[4]吸収極大を持っており、$[Fe(phen)_3]^{2+}$錯体の吸収帯と重なっている。そのため、ブランクを測定した段階で 508.0 nm の光がかなり吸収され、正確、精密な測定ができなかったと考えられる。

同教員によると、この対策として初めに飲料をろ過しておく必要があるということである。これにより、飲料中に沈殿している不溶物を取り除くことができ、より正確、精密な測定ができるとのことである。吸収帯が重なり、$[Fe(phen)_3]^{2+}$錯体による吸収を不安定にしているこれらのカルテノイド類は一般に水に不溶なので、容易にろ過して取り除くことができる。このようにしておけばパッケージに表示されている濃度により近い値が得られていたと考えられる。

なお、表２には OpenOffice.org Calc で計算した濃度も示した。その濃度は分光光度計で求めた濃度より 0.005 ppm ほど大きく計算された。これは 5 倍に希釈した試料溶液での値なので、元の飲料では 0.025 ppm の差となる。これをパッケージに表示されている 200 mL 中の重量に換算すれば、0.005 mg の差となる。この程度の差であれば、パッケージに表示するには十分精度が良いと考えられる。

４．結論

今回は鉄の比色分析について、主に分光光度計での吸光度の測定及びデータ処理に焦点を当て、実験の正確さや精度を検討してきた。検量線の式が分光光度計と OpenOffice.org Calc でほぼ同じだったこと、

表２　飲料から調製した試料について測定した吸光度 A とそれから計算した濃度 c

種類・番号	A	c/ppm	
		分光光度計	OpenOffice.org Calc
ブランク 1	2.662	—	—
試料 1	2.664	0.010	0.015
ブランク 2	2.645	—	—
試料 2	2.658	0.065	0.071
試料 3	2.656	0.055	0.061

R^2 の値がともに 1.000 であったことから、分光光度計によるデータ処理はきわめて精度の良いものであったといえる。このことから、分光光度計による濃度計算は本実験のような定量分析において有力な手段であると考えられる。今後もこの定量演算機能を有効に活用して、効率的に実験を進められるよう指導していきたい。

また、普段学生が行っている実験を今回私が実際に行ったことにより、実験を進めるにあたっての様々な問題点がよく見えるようになった。例えば、今回は試薬がほとんどなく、ほぼ全てを作ったため、相当時間がかかった。２.１節に挙げた試薬及び標準試料の調製に使う特級塩酸（1+1）は、前の班（或いは前年度）からの残りがあれば、それを使って構わない。しかし、なければ当然自分たちで作らなければならない。もし全ての試薬がなくなっていたら、相当時間がかかると思われる。この点については指導上の工夫が必要であると感じた。そして、このような問題点が分かったことにより、自分で実際に手を動かしてみることの大切さが分かった。実験室などの都合で困難ではあるが、可能であればこれからも行っていきたいと思う。

なお、本実験は本来、3～4 人共同で行うものであり、1 回の実験には午後 12 時 40 分から 3 時 50 分までの時間帯を 2 日分費やして行っている。しかし、今回は日程の都合上、1 日で行った。また、共同実験者はいなかった。このため、実際の授業とほぼ同じ午後 1 時ごろ開始した本実験が終了したのは午後 8 時 30 分ごろであり、かなり時間がかかってしまった。共同実験の重要性が身にしみて分かった。今後の指導にあたっては、このことについても学生に理解させるよう努力したい。

今回の実験は普段指導する立場である私にとって、大変貴重な体験であり、本実験を通して多くのことが分かった。今回の体験を今後の指導に是非生かしていきたい。

参考文献

[1] 弘前大学理学部地球科学科編, “地球化学実験”（1996 年）.

[2] 日立編, “取扱説明書 U-2001 形ダブルビーム分光光度計”, 第 4 版（1998 年）.

[3] カロテノイド. http://ja.wikipedia.org/w/index.php?title=%E3%82%AB%E3%83%AD%E3%83%86%E3%83%8E%E3%82%A4%E3%83%89&oldid=20675329 (accessed August 8, 2008), part of 『Wikipedia』. http://ja.wikipedia.org/ (accessed August 8, 2008).

[4] Lycopene (data page). http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lycopene_%28data_page%29&oldid=205038460 (accessed August 8, 2008), part of *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. http://en.wikipedia.org/ (accessed August 8, 2008).